

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C07K 13/00, A61K 37/64, 47/48	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/08229 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Juni 1991 (13.06.91)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP90/01998 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. November 1990 (22.11.90) (30) Prioritätsdaten: P 39 39 800.5 1. Dezember 1989 (01.12.89) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : KURFUERST, Manfred [DE/DE]; Anilinstrasse 71, D-6733 Hassloch (DE). RUBEBSAMEN, Klaus [DE/DE]; Kaiserstuhl 6, D-6730 Neustadt (DE). SCHMIED, Bernhard [DE/DE]; Taunusstrasse 20, D-6710 Frankenthal (DE). KOERWER, Wolfgang [DE/DE]; Auf dem Leimen 10, D-6718 Gruenstadt (DE). SCHWEDEN, Juergen [DE/DE]; Buergermeister-Oberhettinger-Str. 7, D-6705 Deidesheim (DE). HOEFFKEN, Hans, Wolfgang [DE/DE]; Dammstueckerweg 101, D-6700 Ludwigshafen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>

(54) Title: HIRUDINE POLYALKYLENE GLYCOL CONJUGATES

(54) Bezeichnung: HIRUDINPOLYALKYLENGLYKOLKONJUGATE

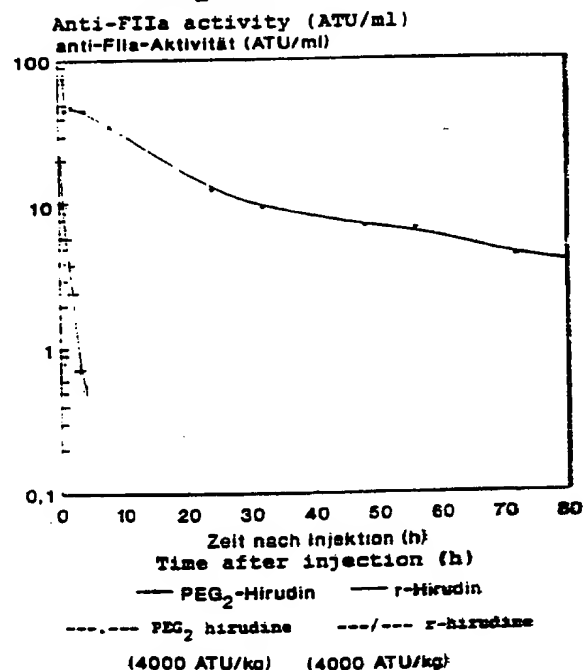
(57) Abstract

Hirudine polyalkylene glycol derivatives of the formula: $[A-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_m-B]_p]$ Hir, and hirudine muteines and their production are described. The compounds are suitable for combatting diseases.

(57) Zusammenfassung

Es werden Hirudinpolyalkylenglykolderivate der Formel: $[A-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_m-B]_p]$ Hir, sowie Hirudin-Muteine und deren Herstellung beschrieben. Die Verbindungen eignen sich zur Bekämpfung von Krankheiten.

Pharmacokinetics
PEG₂ hirudine and r-hirudine
Pharmakokinetik
PEG₂-Hirudin und r-Hirudin



intravenöse Applikation
 intravenous application

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Frankreich	MN	Mongolei
BE	Belgien	GA	Gabon	MR	Mauritanien
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BJ	Benin	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	PL	Polen
CA	Kanada	IT	Italien	RO	Rumänien
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
DE	Deutschland	LU	Luxemburg	TG	Togo
DK	Dänemark	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika

Hirudinpolyalkylenglykokonjugate

Beschreibung

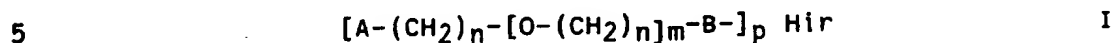
- 5 Die Erfindung betrifft neue Hirudinmoleküle und deren Hirudinpolyalkylenglykokonjugate, deren Herstellung sowie deren Verwendung sowohl zur Prophylaxe und Therapie von kardiovaskulären Krankheiten als auch zur Modifikation makromolekularer Träger.
- 10 Hirudin ist ein seit langer Zeit bekanntes, natürlich vorkommendes Protein mit blutgerinnungshemmenden Eigenschaften. Es ist der stärkste und selektivste bisher bekannte Thrombininhibitor (Naturwissenschaften, (1955) 42, 537; Hoppe-Seylers Z. für Biol. Chemie, (1985) 366, 379). Das aus dem medizinischen Blutegel *Hirudo medicinalis* isolierbare Polypeptid besteht
- 15 aus 65 Aminosäuren, enthält drei Disulfidbrücken und ist an Position Tyrosin 63 sulfatiert. Darüber hinaus existieren noch mehrere natürlich vorkommende Isoformen, die sich vom ursprünglichen Hirudin durch Aminosäureaustausch in verschiedenen Positionen unterscheiden (Folia Haematol. (1988), 115, 30). Ebenso sind gentechnologisch hergestellte Varianten
- 20 bekannt (Biochemistry (1988), 27, 6517, FEBS-Lett. (1988), 229, 87). Hirudin und verschiedene Varianten sind heute auf gentechnologischem Weg zugänglich, wobei den mit gentechnologischen Methoden hergestellten Hirudinen der Sulfatrest an Aminosäure Tyr 63 fehlt (Biochemistry (1989), 28, 2941, DNA (1986), 5, 511). Die gute physiologische Verträglichkeit
- 25 dieses Gerinnungsinhibitors ist ebenfalls seit geraumer Zeit bekannt (Pharmazie (1981), 10, 653).
- Trotz seiner günstigen pharmakodynamischen Eigenschaften ist Hirudin aufgrund seiner geringen Halbwertszeit im Blut von ca. 50 min. für lang
- 30 andauernde therapeutische Anwendungen weniger geeignet. Es ist bekannt, daß die Halbwertszeit von Proteinen durch Konjugation mit Makromolekülen verlängert werden kann (J. Biol. Chem. (1977), 252, 3582; Biochim. Biophys. Acta (1981), 660, 293). Häufig wird nach einer solchen Derivatisierung mit z. B. Polyethylenglykol eine signifikante Verschlechterung der
- 35 enzymatischen Aktivität beobachtet, was die Anwendbarkeit solcher modifizierter Proteine stark einschränkt (Cancer. Treat. Rep. (1979), 63, 1127; Chemistry Lett. (1980), 773). Im Falle von Hirudin konnte von Walsmann kürzlich gezeigt werden, daß durch Kopplung mit Dextran eine deutliche Halbwertszeitverlängerung von ca. 50 min. auf über 7 h erreicht werden
- 40 konnte, allerdings unter drastischem Verlust an Aktivität (Pharmazie (1989), 44, 72). Einer therapeutischen Anwendung solcher Dextran-Hirudine steht trotz der günstig veränderten Halbwertszeit die sehr geringe Aus-

beute an Produkt, die drastisch reduzierte spezifische Aktivität sowie die damit möglicherweise verbundenen Änderungen der pharmakodynamischen Eigenschaften entgegen.

- 5 Eine Konjugation von Proteinen mit Makromolekülen wird häufig über die Reaktion der Carboxylgruppen der Aminosäuren Asparaginsäure oder Glutaminsäure, über die Reaktion der Sulfhydrylgruppe der Aminosäure Cystein oder durch Umsetzung der Seitenketten-Aminogruppe der Aminosäure Lysin des
- 10 Aminosäuren für die Funktion des entsprechenden Proteins von essentieller Bedeutung. Die Derivatisierung eines Proteins kann mit einer Veränderung der physikalisch/chemischen oder enzymatischen Eigenschaften bis hin zur Inaktivierung verbunden sein. Hirudin enthält mehrere Asparaginsäure- und Glutaminsäurereste, hauptsächlich im C-terminalen Bereich des Moleküls.
- 15 Lysinreste, befinden sich in Position 27, 36 und 47 im Hirudinmolekül. Darüberhinaus wäre eine Kopplung über den C-Terminus oder den N-Terminus des Moleküls denkbar. Es ist jedoch bekannt, daß sowohl die sauren Aminosäuren im C-terminalen Bereich (FEBS. Lett. (1983), 164 307-313) als auch die basischen Lysinreste, insbesondere der im Molekül stark exponierte
- ~~20 Lysinrest Nr. 47 an der Interaktion des Hirudins mit der Protease Thrombin entscheidend beteiligt sind (Biol. Chem. Hoppe-Seyler (1985), 366, 379-385). Reaktionen am N-Terminus, wie z.B eine Verlängerung (Biochemistry (1989), 28, 10079) führen zu einer drastischen Abnahme der inhibitorischen Aktivität des Hirudins. Daher war nicht zu erwarten, daß~~
- 25 eine Derivatisierung von Hirudin ohne signifikanten Aktivitätsverlust zu erreichen ist. Diese Erwartung wird durch die von Walsmann (Pharmazie (1989), 44, 72) durchgeführten Arbeiten zur Derivatisierung der Lysinreste des Hirudins mit Dextran deutlich belegt.
- 30 Wegen der großen Zahl saurer Aminosäuren ist bei einer Konjugation von Makromolekülen mit den Carboxylseitenketten des Hirudins kein einheitliches Produkt zu erwarten. Selbst bei einer Derivatisierung nur der basischen Funktionen des Polypeptids wird ein Gemisch aus bis zu 32 verschiedenen Verbindungen erwartet. Bei den Mono-, Di- und Tri-substituier-
- 35 ten Derivaten ist eine große Zahl von Stellungsisomeren denkbar, die sich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften weitgehend gleichen, jedoch in ihrer biologischen Aktivität unterschiedlich sind. Selbst wenn die Mehrzahl der theoretisch denkbaren Konjugate nur im Spurenbereich zur Gesamtmischung beitragen, muß mit erheblichen Problemen bei der Trennung
- 40 von einem inhomogenen Produkt gerechnet werden.

Es wurde nun gefunden, daß die Konjugation von Polyalkylenglykolderivaten durch Einsatz geeigneter Hirudin-Muteine so gut zu steuern ist, daß mit

akzeptablem Reinigungsaufwand chemisch einheitliche Hirudin-Polymer-derivate erhalten werden können. Überraschend war der Befund, daß Hirudin-Polyalkylenglykolderivate der allgemeinen Formel I



worin

10 A einen der Reste -OH, -NH₂, -NH-CO-R, -O-R oder -O-CO-R (mit R in der Bedeutung einer C₁-C₄-Alkylengruppe)

n die Zahl 2, 3 oder 4

m eine Zahl von 50 bis 500

15 B eine direkte kovalente Bindung oder ein Linker,

p die Zahl 1, 2 oder 3 und

20 Hir einen über die Aminogruppe(n) der Lysin-Seitenketten an den (die) (A-(CH₂)_n-(O-(CH₂)_n)_m-B)-p-Reste gebundenen Hirudin-Rest bedeutet,

deutlich verlängerte Bioverfügbarkeiten besitzen, wobei die biologische Wirksamkeit ganz oder weitgehend erhalten bleibt.

25 Als Hirudin-Muteine kommen die folgenden Verbindungen sowie deren Salze der allgemeinen Formel II

30 A-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-
Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-
Val-Cys-Gly- B -Gly-Asn- C -Cys-Ile-Leu-
D -Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-
Pro- E -Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-
Phe-Glu- G -Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu- F

II

35 in Betracht, wobei

40

A = Val-Val
Ile-Thr
Leu-Thr
Pro-Val

5

B = Gln oder Glu

C = Lys, Arg, Asn

D = -Lys-Gly- oder

10

-Gly-U-V-Gly-X-Y- mit

U = Ser, Lys oder eine direkte Bindung

V = Asp, Lys, Asn

15

X = Glu, Gln oder eine direkte Bindung

Y = Lys, Arg, Asn

E = Lys, Arg, Asn, Gln

20

F = Asp, Gln

G = Glu, Pro

bedeutet.

25 Als besonders geeignet für die Konjugation mit PEG erwiesen sich solche Muteine, bei denen die Region zwischen Lysin 30 bis Glutamin 38 verändert wurde. In diesem Bereich lassen sich ein oder auch zwei zusätzliche Lysine einfügen, die dann mit ähnlicher Effizienz koppeln wie Lysinrest 27.

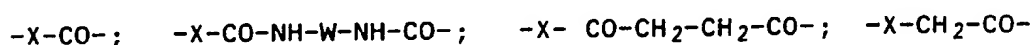
Darüber hinaus ist es im Interesse einer einfacheren Reaktionsführung und
30 eines chemisch einheitlichen Produkts von Vorteil, Lysinreste bei denen eine Umsetzung mit PEG nicht gewünscht wird, durch andere, schwächer nucleophile Aminosäuren zu ersetzen. Als besonders günstig hat bei den obengenannten Muteinen der Austausch von Lys 47 gegen Arg 47 oder auch Gln 47 erwiesen. Die entsprechenden PEG-Mutein-Kopplungsprodukte besitzen
35 ähnlich hohe spezifische Aktivitäten wie das underivatisiertes Mutein.

Durch die Anzahl der vorhandenen bzw. neu eingefügten Lysinreste kann auf den Anteil des koppelbaren Polymers und damit auf das Molgewicht des
Konjugates Einfluß genommen werden.

40 Solche Hirudinmuteine lassen sich sehr gut auf gentechnologischem Weg herstellen. Zunächst stellt man die für das jeweilige Mutein kodierende Nukleinsäure synthetisch her. Diese synthetischen Gene lassen sich dann

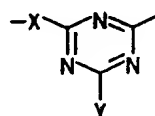
mit geeigneten Regulatorsequenzen (Promotor, Terminator etc.) versehen und in heterologen Systemen zur Expression bringen (FEBS-Lett. (1986) 202, 373 (1986); Biol. Chem. Hoppe-Seyler (1986) 367, 731). Die Expression kann in eukaryontischen Systemen (Mammaliazellen, Hefen oder filamentösen Pilzen) oder in prokaryontischen Systemen (E. coli, Bacilli etc.) erfolgen. Die Expression in E. coli erfolgt bevorzugt über ein Fusionsprotein, aus dem das Hirudin freigesetzt und anschließend aktiviert werden kann (DNA (1986) 5, 511). In den folgenden Beispielen wird exemplarisch die Herstellung von nur einigen der erfindungsmäßig beanspruchten Muteine beschrieben, die übrigen Muteine sind analog zugänglich.

Als Linker B kommen folgende Gruppen in Betracht:



15

oder



mit

X in der Bedeutung von -S-, -O-, -NH- und

20 W in der Bedeutung einer C₂-C₆-Alkylengruppe oder einer p-Phenylengruppe und

Y in der Bedeutung von -Cl, -OH, oder H.

25 Die neuen Hirudinpolyalkylenglykolderivate lassen sich herstellen, indem man Hirudin-Muteine der allgemeinen Formel II umsetzt mit Polyalkylenglykolderivaten der allgemeinen Formel III

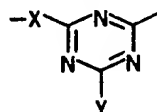


30

worin

A, m und n die bereits angegebene Bedeutung besitzen und

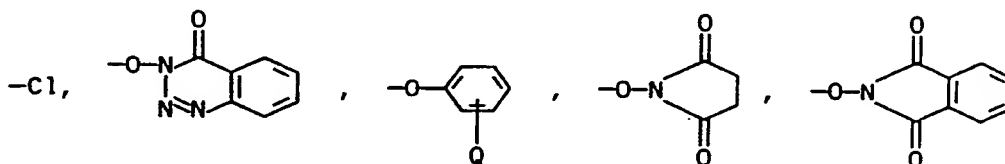
35 E einen der Reste $-X-CO-Z$, $-X-CO-NH-W-N=C=O$, $-X-CO-CH_2-CH_2-CO-Z$, $-X-CH_2-CO-Z$,



, oder $-O-SO_2-R$

mit X, W und Y in der angegebenen Bedeutung und

Z in der Bedeutung von



- 5 Q in der Bedeutung von 1-3 Halogenatomen oder 1-2 Nitrofunktionen oder einer Acetyl-Gruppe und

R in der Bedeutung von Methyl, Ethyl, n-Propyl, i-Propyl, Phenyl, TolyI oder Tresyl.

10

Die Umsetzung von III mit Hirudin-Muteinen geschieht wie folgt:

Das aktivierte Polyalkylenglykol der Formel III wird in stöchiometrischen Mengen oder mit einem Überschuß in einem geeigneten Puffer (pH 6-10), in

- 15 Wasser, gegebenenfalls unter Zusatz einer Hilfsbase wie Natrium- oder Kalium-carbonat oder -hydrogencarbonat, Alkalihydroxid, Triethylamin, N-Methylmorpholin, Diisopropylamin oder Pyridin in einem organischen Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Isopropanol, Acetonitril, Dimethylformamid, N-Methylpyrrolidon, Dichlormethan, Dimethylsulfoxid, Tetrahydro-
 20 furan, 1,4-Dioxan, Toluol) oder in Gemischen der genannten Lösungsmittel bei Temperaturen zwischen -20°C und $+100^{\circ}\text{C}$, bevorzugt bei Temperaturen zwischen 0°C und $+60^{\circ}\text{C}$, mit Hirudin, Desulfatohirudin, einem Hirudin-Mutein zur Reaktion gebracht. Die entstandenen Konjugate werden isoliert und mit den in der Proteinchemie üblichen Methoden gereinigt und
 25 charakterisiert.

- Die erfindungsmäßig beschriebenen Polyalkylen-Hirudin-Konjugate zeigen ein im Vergleich zu Hirudin günstigeres pharmakologisches Wirkprofil. Sie besitzen nicht nur die vorteilhaften pharmakodynamischen Eigenschaften des
 30 Hirudins, sondern weisen darüber hinaus eine erheblich verlängerte biologische Wirksamkeit und eine bessere Bioverfügbarkeit auf. Darüber hinaus zeigen Polyalkylglykol-Hirudin-Konjugate im Vergleich zum Hirudin eine deutlich geringere Antigenität. Aufgrund dieser Eigenschaften sind die beschriebenen Polyalkylen-Konjugate Hirudin, Heparin und niedermolekularem
 35 Heparin bei der Therapie und Prophylaxe thromboembolischer Erkrankung überlegen. Sie lassen sich zum Beispiel erfolgreich bei Myocardinfarkt, bei tiefer Venenthrombose, peripherer arterieller Verschlusskrankheit, Lungenembolie sowie bei extracorporaler Zirkulation z.B. Hämodialyse oder

dem cardio-pulmonarer Bypass verwenden. Darüber hinaus können die Polyalkylenglykol-Hirudin-Konjugate zur Verhinderung der Reocclusion nach Wiedereröffnung arterieller Gefäße durch mechanische Methoden oder Lyse verwendet werden. Weiterhin können die neuen Hirudin-Polyalkylenglykol-Derivate erfolgreich zur Beschichtung von künstlichen Oberflächen wie z.B. Hämodialysemembranen und den dazu erforderlichen Schlauchsystemen, bei Gefäßersatz oder bei Herz-Lungenmaschinen eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in üblicher Weise oral oder parenteral (subkutan, intravenös, intramuskulär, intraperitoneal) verabfolgt werden.

Die Dosierung hängt vom Alter, Zustand und Gewicht des Patienten sowie von der Applikationsart ab. Je nach Applikationsform und Indikation beträgt die tägliche Wirkstoffdosis in der Regel zwischen etwa 20 bis 40.000 ATU/kg Körpergewicht.

Die neuen Verbindungen können in den gebräuchlichen galenischen Applikationsformen fest oder flüssig angewendet werden, z.B. als Lösungen, Salben, Cremes oder Sprays. Diese werden in üblicher Weise hergestellt. Die Wirkstoffe können dabei mit den üblichen galenischen Hilfsmitteln wie Füllstoffen, Konservierungsmitteln, Fließregulierungsmitteln, Netzmitteln, Dispergierungsmitteln, Emulgatoren, Lösungsmitteln und/oder Treibgasen verarbeitet werden (vgl. H. Sucker et al: Pharmazeutische Technologie, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1978).

Beispiel 1

Herstellung der Hirudin-Muteine

30

a) Konstruktion des Vektors

Der Protein A-Vektor pRIT 2T (Abb. 1) ist kommerziell erhältlich und ausführlich beschrieben (Pharmacia Bestell Nr. 27-4808-01). Mit seiner Hilfe lassen sich Peptide und Proteine als Fusionsprotein mit Protein A aus *Staphylococcus aureus* in *E. coli* herstellen. Dazu muß die zu exprimierende Nukleinsäure unter Beibehaltung des Protein A-Leserasters in den Polylinker des Vektors pRIT 2T eingesetzt werden. Die pRIT 2T DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen Eco RI und Sal I nach Angaben der Hersteller geschnitten, der Spaltungsansatz über ein niedrigschmelzendes Agarosegel aufgetrennt und das größere Vektorfragment aus dem Gel in reiner Form isoliert. Die grundlegenden Techniken der Gentechnologie, sowie ausführliche Arbeitsanweisungen finden sich in Sambrook et al. (1989) "Molecular Cloning" 2nd edition, CSH-Press.

b) Die für die erfindungsmäßig beanspruchten Hirudinmoleküle k o d i e r e n d e n Sequenzen wurden mit Hilfe eines DNA-Synthesegerätes der Fa. Applied Biosystems, Modell 380A nach Vorschrift und mit den Chemikalien des Herstellers synthetisiert. Die komplette kodierende Region wurde dabei aus 5 3 Teilsequenzen zu je zwei komplementären Oligonukleotiden zusammengestellt. Die zueinander komplementären Oligonucleotide wurden zusammengegeben, für 5 Minuten auf 90°C erhitzt und über einen Zeitraum von 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Die dabei entstehenden doppelsträngigen Fragmente wurden an ihren 5'-Enden kinasiert und zusammen- 10 ligiert. Das so gebildete Hirudingen konnte in die Eco RI und Sal I Stelle des linearisierten Expressionsvektors pRIT 2T in der richtigen Orientierung und unter Beibehaltung des Protein A-Leserasters eingefügt werden.

Zur Herstellung der verschiedenen Moleküle wurden folgende Sequenzen 15 (Abb. 2) miteinander kombiniert:

20

25

30

35

40

Mutein	kombinierte Sequenzen	Veränderung
Hirudin	1A+2A+3A	-
5 HL 1	1A+2A+3B	Lys47→Arg47
HL 11A	1A+2B+3A	Ser32→Lys32 Asp33→Asn33 Glu35→Gln35
10 HL 11B	1A+2B+3B	Ser32→Lys32 Asp33→Asn33 Glu35→Gln35 Lys47→Arg47
15 HL 12A	1A+2C+3A	Asp33→Lys33 Glu35→Gln35
20 HL 12B	1A+2C+3B	Asp33→Lys33 Glu35→Gln35 Lys47→Arg47
HL 14A	1A+2D+3A	Asp33→Lys33 Lys36→Arg36
25 HL 14B	1A+2D+3B	Asp33→Lys33 Lys36→Arg36 Lys47→Arg47
30 HL 14C	1A+2D+3C	Asp33→Lys33 Lys36→Arg36 Lys47→Gln47

Die nach der Ligation entstehenden chimären Plasmide (pRIT 2T-Hir) werden
 35 zur DNA Amplifikation in einen Lambda-Lysogenstamm transformiert, DNA aus
 Einzelklonen isoliert und durch DNA-Sequenzanalyse auf das Vorliegen der
 korrekten Sequenz hin überprüft.

Beispiel 2

Expression des Fusionsproteins

5 Das jeweilige Expressionsplasmid pRIT 2T-Hir wurde in den Stamm E.coli N 4830-1 (Pharmacia Bestell-Nr. 27-4808-01) transformiert. Dieser Stamm enthält chromosomal den thermosensitiven Lambda-Repressor CI 857.

In einem 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden 100 ml MIM-Medium
10 (MIM = 32 g Trypton, 20 g Hefeextrakt, 6 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 0,5 g NaCl, 1 g NH_4Cl pro Liter und 0,1 mM MgSO_4 sowie 0,001 mM FeCl_3) sterilisiert und Ampicillin (ad 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben. Das Medium wurde mit 1 ml einer frischen Über-Nacht-Kultur des Stammes pRIT 2TA-Hir/N 4830-1 angeimpft und unter Schütteln so lange bei 28°C bebrütet, bis die Absorption
15 bei 550 nm 0,6 betrug. Dann wurden 100 ml 65°C warmes frisches MIM/amp-Medium zugegeben und weitere 4 h bei 42°C bebrütet. In dieser Zeit wurde das gewünschte Fusionsprotein synthetisiert. Durch Zugabe von Lysozym zu 75 mg/l und Inkubation (3h, 37°C) wurde die Zellwand enzymatisch entfernt. Die Zellen konnten dann mechanisch (Manton-Gaulin Presse, Einfrierzyklus,
20 heftiges Rühren), durch einen Hitzeschock bis 80°C oder eine hypotone Lyse aufgeschlossen und das lösliche Fusionsprotein ins Medium freigesetzt werden.

Beispiel 3

25

Reinigung des Fusionsproteins

Die Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation entfernt und der klare Überstand über eine IgG-Sepharose-Säule (IgG-Sepharose® 6 "Fast Flow",
30 Pharmacia, Best.Nr. 17-0969-01) gepumpt. Die Lagerung des Säulenmaterials, Vorbereitung und Auslegung der Säule, Auftragsbedingungen und Flußraten richten sich nach den Angaben des Herstellers. So wurden für 6 l Überstand ein Gelbett von 200 ml und eine Flußrate von ca. 3 l/h verwendet. Bei diesem Schritt wurde das Fusionsprotein über seinen IgG-bindenden Protein
35 A-Teil reversibel an die Gelmatrix gebunden (Ausbeute ca. 95 %). Nach dem Auftrag wurde die Säule mit 10 Bettvolumina TST (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl und 0,05 % Tween®20) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 0,5 M Acetatpuffer pH 2,8.

Beispiel 4**Spaltung des Fusionsproteins**

- 5 Das Säuleneluat aus Beispiel 3 wurde lyophilisiert und bei -20°C gelagert. Zur Spaltung wurde es in 70 %iger Ameisensäure zu einer Proteinkonzentration von ca. 25 g/l aufgenommen. Nach Spülen mit Argon wurde zur Abspaltung des Hirudins 1 g BrCN als Feststoff pro g Fusionsprotein zugegeben. Die Spaltung erfolgte unter Argon bei 37°C in ca. 4 h. Das überschüssige
- 10 Bromcyan, das Lösungsmittel und weitere flüchtige Bestandteile wurden durch Lyophilisation entfernt. Anschließend wurde dreimal mit Wasser gewaschen.

Beispiel 5

- 15 Renaturierung und Reinigung von Hirudin oder Hirudinmuteinen

- Das Lyophilisat wurde zu 1-100 mg/ml Protein in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 0,2 M DTT aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von
- 20 2 h wurde die Probe durch G-10-Ausschlußchromatographie (äquilibriert mit 10 mM HCl) entsalzt. Die entsalzte Probe wurde 1:20 in 0,1 M Tris/HCl, 5 mM GSH/0,5 mM GSSG, 1 mM EDTA, pH 8,7 verdünnt und 1 h inkubiert (GSH ist reduziertes und GSSH oxidiertes Glutathion). Durch diese Behandlung stieg die spezifische Aktivität des Hirudins um den Faktor 3-5. Nach
- 25 Einstellen des pH-Wertes auf pH 7,6 mit HCl, Zugabe von NaCl auf 150 mM und Tween®20 auf 0,05 % wurde die Chromatographie über IgG-Sephrose wiederholt (Beispiel 3). Während der Protein A-Fusionspartner und ungespaltenes Fusionsprotein an die Säule banden, befand sich das aktive
- 30 klassische proteinchemische Verfahren bis zur klinischen Reinheit weiter aufgereinigt werden.

Beispiel 6

- 35 Darstellung des Methoxy-polyethylenglykol(8000)-N-succinimido-carbonats

a) N-Succinimido-chloroformiat

- In eine Lösung von ca. 30 g Phosgen in 200 ml Dichlormethan werden bei 0°C
- 40 innerhalb von 30 Minuten 21,0 g N-Hydroxysuccinimid-Kaliumsalz eingetragen und das Gemisch 2 h bei 0°C gerührt. Anschließend wird für 1 h Stickstoff durch die Suspension geleitet, um überschüssiges Phosgen abzu-

blasen (Waschturm). Die 10.6 g N-Succinimido-chloroformiat liegen als gelbliches Öl vor und sind mit anorganischen Salzen und Di-succinimido-carbonat verunreinigt. Das Rohprodukt kann ohne weitere Reini-
5 gung für die Umsetzung mit Polyalkylenglykolen eingesetzt werden, oder durch Lösen in 150 ml Diethylether, Filtration und erneutes Einengen von anorganischen Salzen befreit werden.

b) Methoxy-polyethylenglykol(8000)-N-succinimido-carbonat

10 10.0 g Methoxy-PEG(8000)-OH werden durch leichtes Erwärmen in 20 ml trockenem Pyridin gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung mit 890 mg N-Succinimido-chloroformiat versetzt und über Nacht gerührt. Nach Zugabe von einem Überschuß Diethylether wird das Gemisch
15 30 min im Eisbad gerührt, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, 2 mal aus Isopropanol umkristallisiert, aus Diethylether gefällt, filtriert und getrocknet. 8.10 g Methoxy-polyethylenglykol(8000)-N-succinimido-carbonat fallen als farbloser Feststoff an.

20 Beispiel 7

Darstellung von Methoxy-polyethylenglykol(8000)-4-nitrophenyl-carbonat

a) 4-Nitrophenyl-chloroformiat

25 In eine Suspension von 20.0 g Nitrophenol in 60 ml Toluol werden bei 0°C ca. 43 g Phosgen eingegast. Das Gemisch wird 4-5 h bei 0°C gerührt. Anschließend wird bei -15°C langsam eine Lösung von 20 ml Triethylamin in 20 ml Toluol zugetropft und über Nacht im auftauenden Kältebad gerührt.
30 Überschüssiges Phosgen wird durch Stickstoff ausgeblasen und das Reaktionsgemisch anschließend filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Die 33.7 g ölig, bräunlicher Rückstand enthalten neben 4-Nitrophenol-chloroformiat noch Lösungsmittel und Salz. Das Gemisch
35 werden.

b) Methoxy-polyethylenglykol(8000)-4-nitrophenyl-carbonat

Darstellung und Reinigung analog zu Beispiel 6.

Beispiel 8

Darstellung von Methoxy-polyethylenglykol(8000)-2,4,5-trichlor-phenylcarbonat

5

a) 2,4,5-Trichlorphenyl-chloroformiat

In eine Lösung von 10.0 g 2,4,5-Trichlorphenol in 50 ml Dichlormethan werden bei 0°C ca. 7 g Phosgen eingegast und das Gemisch 15 min bei 0°C gerührt. 7.2 ml Chinolin in 20 ml Dichlormethan werden innerhalb von 30 min zugetropft und die orangefarbene Suspension noch 1 h im Eisbad gerührt. Anschließend wird 1 h Stickstoff durch die Suspension geleitet, um überschüssiges Phosgen abzublasen (Waschturm). Das Gemisch wird anschließend filtriert, das Filtrat 2 mal mit Wasser gewaschen, getrocknet, erneut filtriert und im Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Die 4.45 g ölicher, bräunlicher Rückstand sind relativ sauberes 2,4,5-Trichlorphenylchloroformiat, das im Kühlschrank kristallisiert und ohne weitere Reinigung eingesetzt werden kann.

20 b) Methoxy-polyethylenglykol(8000)-2,4,5-trichlor-phenylcarbonat

Darstellung und Reinigung analog zu Beispiel 6.

Beispiel 9

25

Herstellung von PEG₁-Hirudin durch Umsetzung von Methoxy-polyethylenglykol(8000)-4-nitrophenylcarbonat mit Hirudin

40 mg Desulfatohirudin (spezifische Aktivität: 8000 ATU/mg) werden in 20 ml 0,1 M Boratpuffer, pH 8,0 gelöst und mit 80 mg Methoxy-polyethylenglykol(8000)-4-nitrophenylcarbonat versetzt und für 3 Stunden bei 25°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit einem 100 fach molaren Überschuß an Tris Base wird der Reaktionsansatz gegen 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 dialysiert und die entstandene Produktmischung auf einer HP-Q-Sepharose®-Säule (Pharmacia®) aufgetragen. Die Säule wird mit einem linearen NaCl Gradienten von 0 bis 400 mM NaCl in 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 entwickelt. Das PEG₁-Hirudin-Konjugat eluiert bei 200 mM NaCl.

Die Ausbeute an PEG₁-Addukt im Kopplungsansatz liegt bei ca. 50 %, die verbleibenden 50 % des Hirudins liegen als PEG₂-Derivat oder underivatisiert vor.

Die spezifische Aktivität des aus dem Kopplungsansatz gereinigten PEG₁-Hirudin-Konjugats betrug 8000 U/mg Protein (bestimmt durch Thrombin-inhibitionstest mit dem chromogenen Substrat S 2238 (Kabi), (FEBS-Lett. (1983), 164, 307), Protein durch BCA-Test mit Serumalbumin als Standard 5 (Pierce) bestimmt), das Molgewicht des Konjugates 15000 Da (Superose®-12-Chromatographie, Pharmacia).

Beispiel 10

10 Herstellung von PEG₂-Hirudin

40 mg Desulfatohirudin werden in 10 ml 0,05 M Natriumborat- oder Natrium-carbonatpuffer, pH 8,0 gelöst und mit einer Lösung von 240 mg 2,4,5-Tri-chlorphenyl- oder 4-Nitrophenyl-aktiviertem Methoxypolyethylenglykol
15 (8000 Da) in H₂O oder 1,4 Dioxan versetzt und für 3 Stunden bei 25°C in-kubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit einem 100 fach molaren Überschuss an Tris Base wird der Reaktionsansatz gegen 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 dialy-siert. Die entstandene Produktmischung wird auf eine HP-Q-Sepharose®-Säule aufgetragen und die Säule dann mit einem linearen NaCl Gradienten von 0
20 bis 400 mM NaCl entwickelt. Der PEG₂-Hirudin-Komplex eluiert bei 120-130 mM NaCl.

Der Anteil an PEG₂-Hirudin betrug im Kopplungsansatz ca. 50%, der Rest des Hirudins verteilte sich auf PEG-Derivate mit 1 und 3 gebundenen PEG-
25 Resten.

Die spezifische Aktivität des gereinigten PEG₂-Konjugates wurde wie bei Beispiel 9 beschrieben ermittelt und betrug 6200 U/mg Protein, das Molgewicht des Konjugates 22000 Da - 23.000 Da (Superose®-12).

30

Beispiel 11

Umsetzung des Hirudinmureins HL 14B mit Methoxy-polyethylen-glykol(8000)-4-nitrophenylcarbonat

35

10 mg des Hirudinmureins HL 14B (spezifische Aktivität 8900 ATU/mg) wurden gemäß Beispiel 10 zu einer Konzentration von 20 mg/ml in 0,1 M Natrium-carbonat, Puffer pH 8,0 gelöst, mit 80 mg 4-Nitrophenyl-aktiviertem Methoxypolyethylenglykol (8000 Da), gelöst in 0,5 ml 1,4 Dioxan, versetzt
40 und für 3 Stunden bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wird dann durch Zusatz eines 100 fachen Überschusses an Tris-Base abgestoppt, freigesetztes 4-Nitrophenol durch Extraktion entfernt und das Hirudin-PEG Konjugat durch Anionenaustauschchromatographie (siehe Beispiel 9) gereinigt.

Der Anteil des gewünschten PEG₂-Derivates im Kopplungsansatz lag bei ca. 80-85 %; der Anteil der ungewünschten PEG₁- und PEG₃-Derivate betrug jeweils maximal etwa 5-10%. Die spezifische Aktivität des gereinigten PEG₂-HL 14B-Konjugates betrug 8300 U/mg Protein. Das Molgewicht wurde 5 durch Superose®-Gelfiltration zu 22000-23000 Da bestimmt.

Beispiel 12

Pharmakokinetik von PEG₂-Hirudin-Konjugaten

10

2 Gruppen von Hunden (Beagle-Hunde, je 4 Tiere pro Gruppe) wurden jeweils 4000 U/kg PEG₂-Hirudin intravenös oder subkutan appliziert (0.2 ml Vol). 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 32, 48, 56, 72 und 80 h nach der Injektion wurden je 2 ml Blut in 0,1 M Na-Citrat entnommen. Anschließend wurde 15 plättchenarmes Plasma durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 4000 g hergestellt und die plasmatische PEG-Hirudin Konzentration durch die Thrombinhemmung im chromogenen Substratassay mit S 2238 (Kabi) ermittelt. Zum Vergleich wurden dieselben Hunde in einem weiteren Experiment mit Hirudin behandelt. Der zeitliche Verlauf der Plasma-Hirudinkonzentration 20 wurde anschließend wie oben beschrieben bestimmt.

In Abbildung 3 und 4 ist der Zeitverlauf der Anti-Faktor-IIa-Aktivitäten nach intravenöser und subkutaner Applikation von PEG₂-Hirudin und undervatisiertem Hirudin dargestellt. Aus den Absolutwerten und dem zeitlichen 25 Verlauf der Eliminierungskurve ist die deutlich verlängerte biologische Wirkdauer sowie die bessere Bioverfügbarkeit des PEG₂-Hirudin-Derivates ersichtlich.

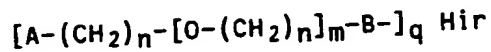
30

35

40

Patentansprüche

1. Konjugate der Formel I aus Polyalkylenglykol oder Polyalkylenglykol-
derivaten mit Hirudin, Desulfatohirudin oder blutgerinnungshemmenden
Hirudin-Muteinen



I

worin

10

A einen der Reste -OH, -NH₂, -NH-CO-R, -O-R oder -O-CO-R (mit R in
der Bedeutung einer C₁-C₄-Alkylengruppe)

n die Zahl 2, 3 oder 4

15

m eine Zahl von 50 bis 500

B eine direkte kovalente Bindung oder ein Linker,

20

p die Zahl 1, 2 oder 3 bedeutet und

Hir für einen über die Aminogruppe(n) der Lysin-Seitenketten an den
(die) A-(CH₂)_n-(O-(CH₂)_n)_m Rest(e) gebundenes Polypeptid der
allgemeinen Formel

25

A-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-
Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-
Val-Cys-Gly- B -Gly-Asn- C -Cys-Ile-Leu-
D -Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-
Pro- E -Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-
Phe-Glu- G -Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu- F

30

steht, mit der Bedeutung von

35

A = Val-Val
Ile-Thr
Leu-Thr
Pro-Val

40

B = Gln oder Glu

C = Lys, Arg, Asn
D = -Lys-Gly- oder

-Gly-U-V-Gly-X-Y- mit

- 5 (U = Ser, Lys, oder eine direkte Bindung
V = Asp, Lys, Asn
X = Glu, Gln, oder eine direkte Bindung
Y = Lys, Arg, Asn)

10

E = Lys, Arg, Asn, Gln
F = Asp, Gln
G = Glu, Pro.

- 15 2. Konjugate gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polyalkylenglykol ein Polyethylenglykol ist.

3. Konjugate gemäß Anspruch 2, wobei das Molgewicht des Polyethylenglykols zwischen 4000 und 15000 Da liegt.

20

4. Konjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder zwei Polymerreste am Hirudin angeknüpft sind.

- 25 5. Hirudinmuttereine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Aminosäuren in den Positionen 30 bis 38 ausgetauscht bzw. deletiert sind.

6. Hirudinmuttereine gemäß Anspruch 5, enthaltend in den Positionen 30 bis 38 ein oder zwei zusätzliche(s) Lysinreste.

30

7. Hirudinmuttereine nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich in Position 47 und/oder Position 36 Lysin gegen Arginin oder Glutamin ausgetauscht ist.

- 35 8. Hirudinmutterein gemäß Anspruch 5 der Formel

40

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-
Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-
Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-
Gly-Lys-Asn-Gly-Gln-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-
Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-
His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-
Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.

9. Hirudinmucin gemäß Anspruch 5 der Formel

5 Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-
 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-
 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-L u-
 Gly-Ser-Lys-Gly-Gln-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-
 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-
 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-
 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.

10

10. Hirudinmucin gemäß Anspruch 5 der Formel

15 Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-
 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-
 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-
 Gly-Ser-Lys-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Cys-Val-
 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-
 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-
 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.

20

11. Hirudinmucin gemäß Anspruch 5 der Formel

25 Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-
 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-
 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-
 Gly-Ser-Lys-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Cys-Val-
 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Arg-Pro-Gln-Ser-
 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-
 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.

30

12. Hirudinmucin gemäß Anspruch 5 der Formel

35 Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-
 Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-
 Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-
 Gly-Ser-Lys-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Cys-Val-
 Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Gln-Pro-Gln-Ser-
 His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-
 Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.

40

13. Hirudinmoleküle nach Anspruch 5 bis 12, sowie die entsprechenden Polymer-Konjugate gemäß Anspruch 1 bis 4 zur Bekämpfung von Krankheiten.

5 14. Hirudinmoleküle gemäß Anspruch 5 bis 12 zur Beschichtung von Oberflächen.

15. Polymer-Konjugate gemäß Anspruch 1 bis 4 zur Beschichtung von Oberflächen.

10

15

20

25

30

35

40

1 / 5

Abb. 1

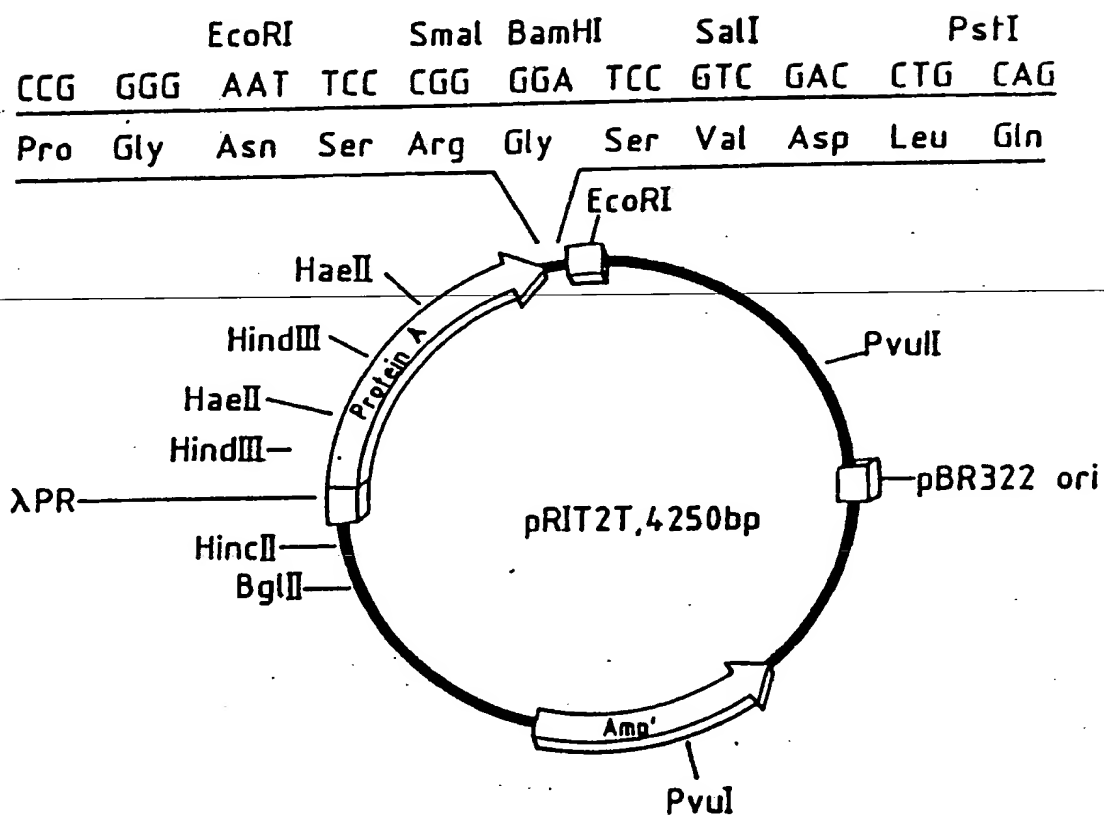


Abb. 2

verwendete synthetische DNA-Fragmente:

Fragment 1A:

aat tca atc gat act atg gtt gtt tac act gac tgc act gaa tcc ggt cag aac ctg tgc ctg tgc gaa ggc tct aac gtt tgc ggc cag ggc
 gt tag cta tga tac caa caa atg tga ctg acg tga ctt agg cca gtc ttg gac acg gac acg ctt cct cag aga ttg caa a
 Met val val tyr thr asp cys thr glu ser gly gln asn leu cys leu cys glu gly ser asn val (cys gly gln gly) 25
 1 5 10 15 20

Fragment 2A:

aac aaa tgc atc ctg ggc tct gac ggc gaa aaa aac cag tgc gtt act ggc gaa ggt ac
 cg ccg gtc ccg ttg ttt acg tag gac ccg aga ctg ccg ctt ttt ttg gtc acg caa tga ccg ctt c
 (gly gln gly)asn lys cys ile leu gly ser asp gly glu lys asn gln cys val thr gly glu (gly) 40
 25 30 35

Fragment 2B:

aac aaa tgc atc ctg ggc aaa aac ggc cag aaa aac cag tgc gtt act ggc gaa ggt ac
 cg ccg gtc ccg ttg ttt acg tag gac ccg ttt ttg gtc acg caa tga ccg ctt c
 (gly gln gly)asn lys cys ile leu gly lys asn gly gln lys asn gln cys val thr gly glu (gly) 40
 25 30 35

Fragment 2C:

aac aaa tgc atc ctg ggc tct aaa ggc cag aaa aac cag tgc gtt act ggc gaa ggt ac
 cg ccg gtc ccg ttg ttt acg tag gac ccg aga ttt ccg gtc ttt ttg gtc acg caa tga ccg ctt c
 (gly gln gly)asn lys cys ile leu gly ser lys gly gln lys asn gln cys val thr gly glu (gly) 40
 25 30 35

Fragment 2D:

aac aaa tgc atc ctg ggc tct aaa ggc gaa cgt aac cag tgc gtt act ggc gaa ggt ac
 cg ccg gtc ccg ttg ttt acg tag gac ccg aga ttt ccg ctt gca ttg gtc acg caa tga ccg ctt c
 (gly gln gly)asn lys cys ile leu gly ser lys gly glu arg asn gln cys val thr gly glu (gly) 40
 25 30 35

ERSATZBLATT

Fragment 3A:

c ccg aaa ccg cag tct cac aac gac ggc gac ttc gaa gaa atc ccg gaa gaa tac ctg cag taa tag g
 ca tgg ggc ttt ggc gtc aga gtg ttg ttg ctg ccg ctg aag ctt ctt tag ggc ctt ctt atg gac gtc att atc cag ct
 (Thr)Pro Lys Pro Gln Ser His Asn Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln End End
 45 50 55 60 65

Fragment 3B:

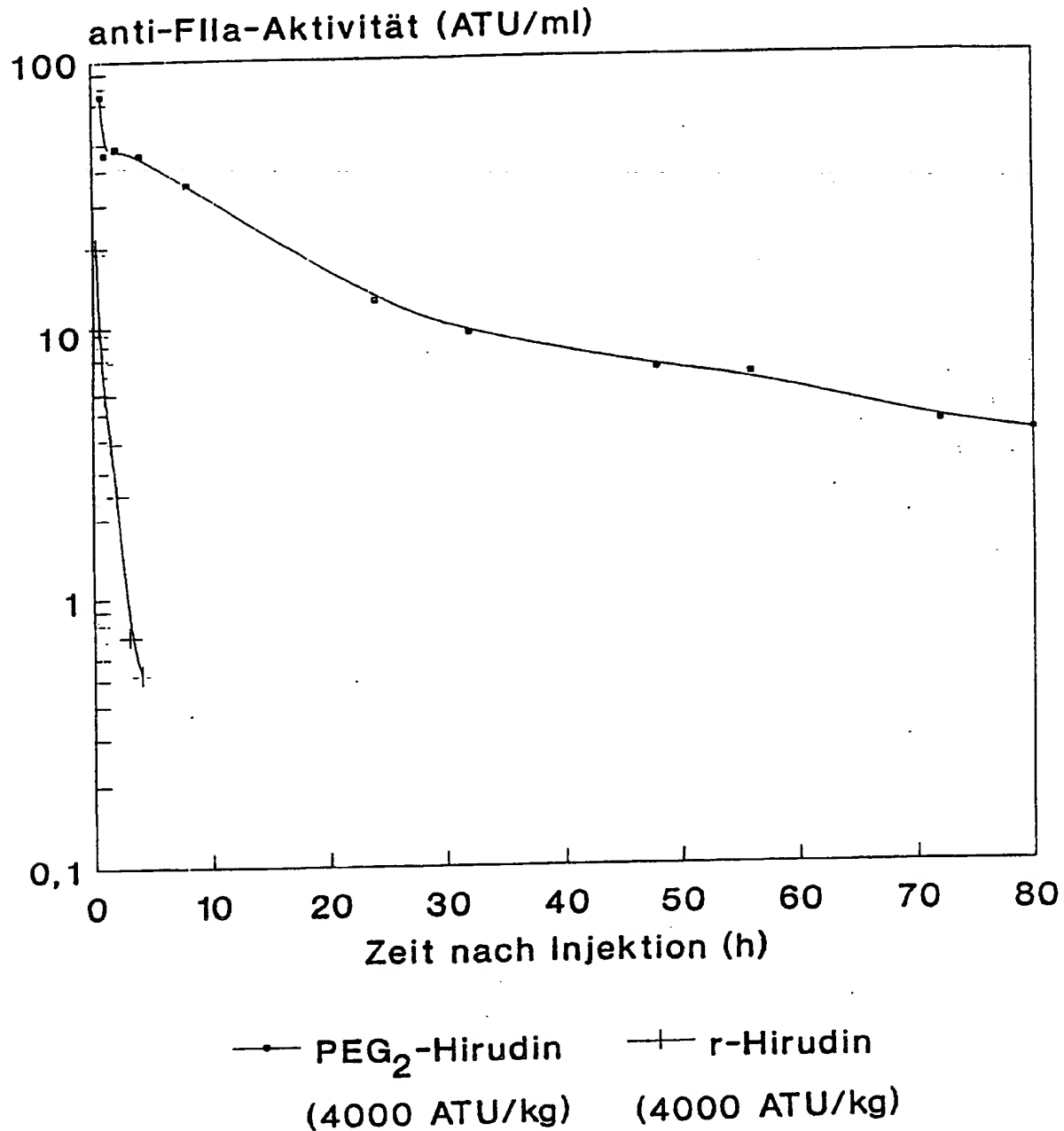
c ccg cgt ccg cag tct cac aac gac ggc gac ttc gaa gaa atc ccg gaa gaa tac ctg cag taa tag g
 ca tgg ggc gca ggc gtc aga gtg ttg ttg ctg ccg ctg aag ctt ctt tag ggc ctt ctt atg gac gtc att atc cag ct
 (Thr)Pro Arg Pro Gln Ser His Asn Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln End End
 45 50 55 60 65

Fragment 3C:

c ccg cag ccg cag tct cac aac gac ggc gac ttc gaa gaa atc ccg gaa gaa tac ctg cag taa tag g
 ca tgg ggc gtc ggc gtc aga gtg ttg ttg ctg ccg ctg aag ctt ctt tag ggc ctt ctt atg gac gtc att atc cag ct
 (Thr)Pro Gln Pro Gln Ser His Asn Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln End End
 45 50 55 60 65

Pharmakokinetik

PEG₂-Hirudin und r-Hirudin



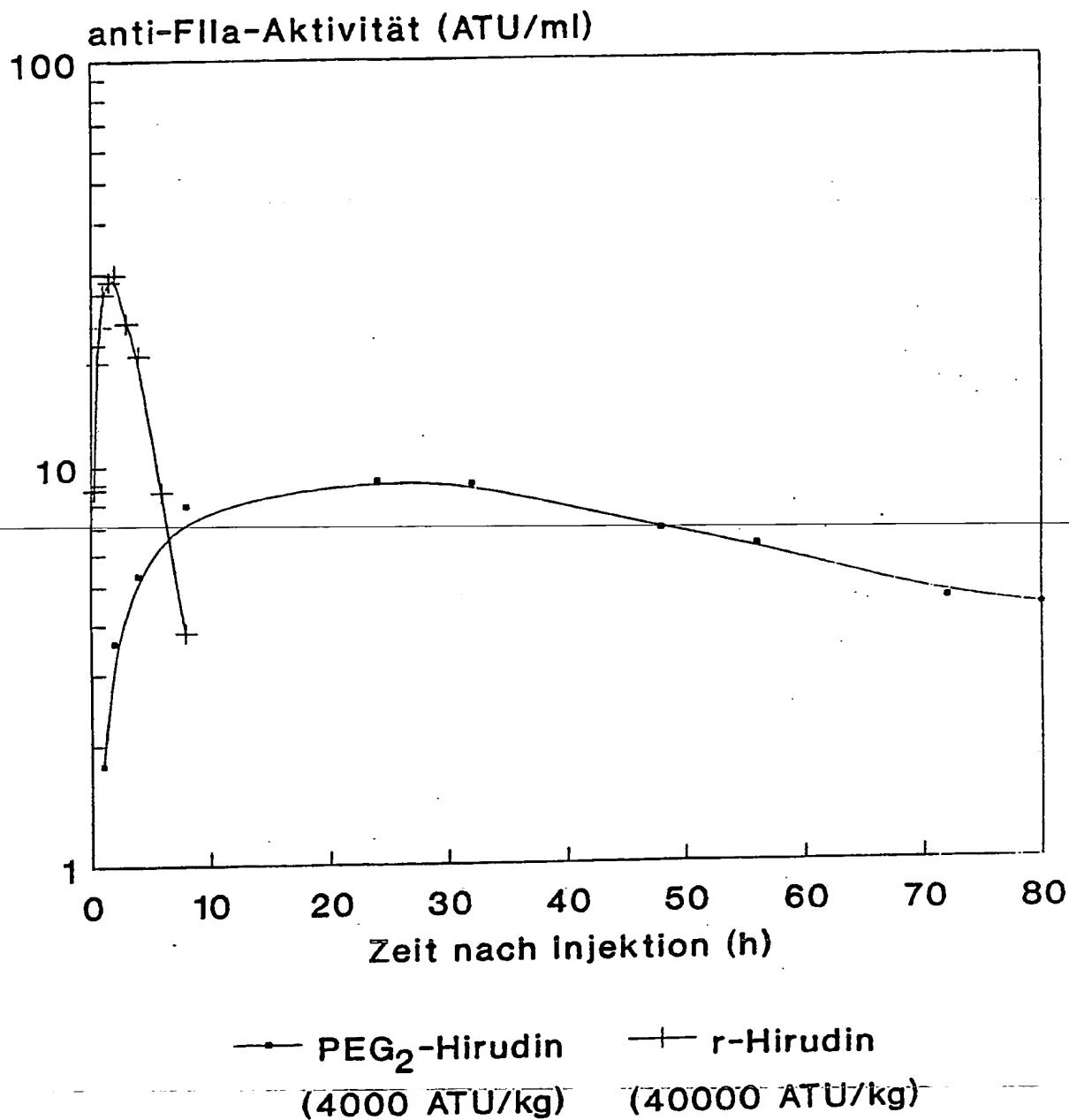
intravenöse Applikation

Abb. 3

5 / 5

Pharmakokinetik

PEG₂-Hirudin und r-Hirudin



subkutane Applikation

Abb. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 90/01998

I. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁵ C 07 K 13/00, A 61 K 37/64, A 61 K 47/48																	
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: right; font-size: small;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 20%; text-align: left; padding: 2px;">Classification System</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl.⁵</td> <td style="padding: 5px;">C 07 K; A 61 K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: x-small; margin-top: 5px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. ⁵	C 07 K; A 61 K											
Classification System	Classification Symbols																
Int.Cl. ⁵	C 07 K; A 61 K																
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; text-align: left; padding: 2px;">Category ¹⁰</th> <th style="width: 60%; text-align: left; padding: 2px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%; text-align: left; padding: 2px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">P, X</td> <td style="padding: 5px;">EP, A2, 0367489 (BAXTER INTERNATIONAL INC.) 9 May 1990, see the whole document <div style="text-align: center;">--</div></td> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">1</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">Y</td> <td style="padding: 5px;">EP, A2, 0236987 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 16 September 1987, see the whole document <div style="text-align: center;">--</div></td> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">1-15</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">Y</td> <td style="padding: 5px;">EP, A2, 0341215 (CIBA-GEIGY) 8 November 1989, see the whole document <div style="text-align: center;">--</div></td> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">1-15</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">Y</td> <td style="padding: 5px;">EP, A1, 0332523 (TRANSGENE S.A.) 13 September 1989, see the whole document <div style="text-align: center;">--</div></td> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">1-15</td> </tr> </table>			Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	P, X	EP, A2, 0367489 (BAXTER INTERNATIONAL INC.) 9 May 1990, see the whole document <div style="text-align: center;">--</div>	1	Y	EP, A2, 0236987 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 16 September 1987, see the whole document <div style="text-align: center;">--</div>	1-15	Y	EP, A2, 0341215 (CIBA-GEIGY) 8 November 1989, see the whole document <div style="text-align: center;">--</div>	1-15	Y	EP, A1, 0332523 (TRANSGENE S.A.) 13 September 1989, see the whole document <div style="text-align: center;">--</div>	1-15
Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³															
P, X	EP, A2, 0367489 (BAXTER INTERNATIONAL INC.) 9 May 1990, see the whole document <div style="text-align: center;">--</div>	1															
Y	EP, A2, 0236987 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 16 September 1987, see the whole document <div style="text-align: center;">--</div>	1-15															
Y	EP, A2, 0341215 (CIBA-GEIGY) 8 November 1989, see the whole document <div style="text-align: center;">--</div>	1-15															
Y	EP, A1, 0332523 (TRANSGENE S.A.) 13 September 1989, see the whole document <div style="text-align: center;">--</div>	1-15															
<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: x-small;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>																	
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center;">27 February 1991 (27.02.91)</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center;">22 March 1991 (22.03.91)</div> </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> International Searching Authority <div style="text-align: center;">European Patent Office</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center;">27 February 1991 (27.02.91)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center;">22 March 1991 (22.03.91)</div>	International Searching Authority <div style="text-align: center;">European Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer											
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center;">27 February 1991 (27.02.91)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center;">22 March 1991 (22.03.91)</div>																
International Searching Authority <div style="text-align: center;">European Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer																

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
Y	EP, A2, 0324712 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 19 July 1989, see the whole document ----- C	1-15


**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. PCT/EP 90/01998**

SA 42460

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 31/01/91
The European Patent office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A2- 0367489	09/05/90	NONE	
EP-A2- 0236987	16/09/87	JP-A- 63010800	18/01/88
EP-A2- 0341215	08/11/89	AU-D- 3382889 JP-A- 2104279	09/11/89 17/04/90
EP-A1- 0332523	13/09/89	FR-A- 2628429 JP-A- 2009390	15/09/89 12/01/90
EP-A2- 0324712	19/07/89	AU-D- 1828488 JP-A- 2005891 DE-A- 3900626	24/08/89 10/01/90 27/07/89

For more details about this annex : see Official Journal of the European patent Office, No. 12/82

I. KLASSEIFIKATION DES ANMELDUNGSGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl.5 C 07 K 13/00, A 61 K 37/64, A 61 K 47/48		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl.5	C 07 K; A 61 K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
P, X	EP, A2, 0367489 (BAXTER INTERNATIONAL INC.) 9 Mai 1990, siehe Dokument insgesamt --	1
Y	EP, A2, 0236987 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 16 September 1987, siehe Dokument insgesamt --	1-15
Y	EP, A2, 0341215 (CIBA-GEIGY AG) 8 November 1989, siehe Dokument insgesamt --	1-15
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
27. Februar 1991		22.03.91
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
Europäisches Patentamt		F.W. HECK 

III. EINSCHLÄSSELIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP, A1, 0332523 (TRANSGENE S.A.) 13 September 1989, siehe Dokument insgesamt --	1-15
Y	EP, A2, 0324712 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 19 Juli 1989, siehe Dokument insgesamt -- -----	1-15

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.PCT/EP 90/01998

SA 42460

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 31/01/91
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A2- 0367489	09/05/90	KEINE	
EP-A2- 0236987	16/09/87	JP-A- 63010800	18/01/88
EP-A2- 0341215	08/11/89	AU-D- 3382889 JP-A- 2104279	09/11/89 17/04/90
EP-A1- 0332523	13/09/89	FR-A- 2628429 JP-A- 2009390	15/09/89 12/01/90
EP-A2- 0324712	19/07/89	AU-D- 1828488 JP-A- 2005891 DE-A- 3900626	24/08/89 10/01/90 27/07/89

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82